

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

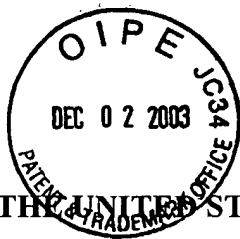
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of: **ONO, Shin-ichi**

Group Art Unit: **1645**

Serial No.: **10/606,803**

Examiner: **Not Yet Assigned**

Filed: **June 27, 2003**

P.T.O. Confirmation No.: **5895**

For. **CYTOTOXIC ASSAY AND NEW ESTABLISHED CELL LINE OF STURGEON  
ORIGIN**

**CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Date: December 2, 2003

Sir:

The benefit of the filing dates of the following prior foreign applications are hereby requested for the above-identified application, and the priority provided in 35 U.S.C. 119 is hereby claimed:

**Japanese Appln. No. 2002-189282, filed June 28, 2002**

**Japanese Appln. No. 2002-189283, filed June 28, 2002**

**Japanese Appln. No. 2003-160007, filed June 04, 2003**

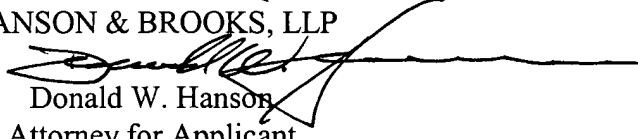
In support of this claim, the requisite certified copies of said original foreign applications are filed herewith.

It is requested that the file of this application be marked to indicate that the applicants have complied with the requirements of 35 U.S.C. 119 and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of said certified copies.

In the event that any fees are due in connection with this paper, please charge our Deposit Account No. 01-2340.

Respectfully submitted,

ARMSTRONG, KRATZ, QUINTOS,  
HANSON & BROOKS, LLP

  
Donald W. Hanson  
Attorney for Applicant  
Reg. No. 27,133

DWH/bjb  
Atty. Docket No. **030791**  
Suite 1000  
1725 K Street, N.W.  
Washington, D.C. 20006  
(202) 659-2930



**23850**

PATENT TRADEMARK OFFICE

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日  
Date of Application:

2002年 6月28日

出 願 番 号  
Application Number:

特願2002-189282

[ST.10/C]:

[JP2002-189282]

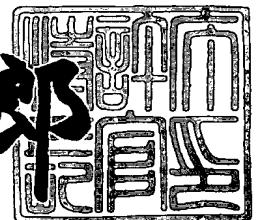
出 願 人  
Applicant(s):

株式会社フジキン

2003年 6月20日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2003-3048823

【書類名】 特許願  
【整理番号】 02P119WW  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N 5/06

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県清水市草薙 1 1 8 1 - 1 6

【氏名】 小野 信一

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘 1 8 番地 株式会社フジキン  
筑波研究工場内

【氏名】 平岡 潔

【特許出願人】

【識別番号】 390033857

【氏名又は名称】 株式会社フジキン

【代理人】

【識別番号】 100087745

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 善廣

【選任した代理人】

【識別番号】 100098545

【弁理士】

【氏名又は名称】 阿部 伸一

【選任した代理人】

【識別番号】 100106611

【弁理士】

【氏名又は名称】 辻田 幸史

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 070140

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 微生物の受託証（受託番号 F E R M P - 1 8 9 0 9 ）の  
写し 1

【提出物件の特記事項】 手続補足書により提出する。

【物件名】 微生物の受託証（受託番号 F E R M P - 1 8 9 1 0 ）の  
写し 1

【提出物件の特記事項】 手続補足書により提出する。

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 チョウザメ由来の新規な株化細胞

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 チョウザメ眼球由来の株化細胞。

【請求項 2】 チョウザメがベステルである請求項 1 記載の株化細胞。

【請求項 3】 眼球上皮細胞由来である請求項 1 記載の株化細胞。

【請求項 4】 虹彩色素上皮細胞由来である請求項 1 記載の株化細胞。

【請求項 5】 細胞外基質を添加することなしに継代培養が可能な請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の株化細胞。

【請求項 6】 50 回以上の継代培養が可能な請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載の株化細胞。

【請求項 7】 20℃での培養開始後 2 日目～6 日目のダブリングタイムが 50 時間未満である請求項 1 乃至 6 のいずれかに記載の株化細胞。

【請求項 8】 培養皿に添加してから接着するまでの着定率が 1 時間後に 75 % 以上である請求項 1 乃至 7 のいずれかに記載の株化細胞。

【請求項 9】 チョウザメ眼球由来の株化細胞である STIP-1 細胞 (FERM P-18909)。

【請求項 10】 チョウザメ眼球由来の株化細胞である STIP-3 細胞 (FERM P-18910)。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、チョウザメのウィルス感染症の診断などへの利用が期待される新規な株化細胞に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、水産養殖技術は、養殖可能な魚類の広汎化や供給安定性の向上などの点において目覚ましい発展を続けているが、その反面において、細菌やウィルスなどの感染症による養殖魚の斃死も問題となっている。特に、ウィルス感染症は、大

量斃死を伴うことが多いにもかかわらず有効な対策がないのが実情である。従って、ウイルス感染症に対しては、いかに早期に診断を行うかということが重要となる。

ウイルス感染症の診断を行うためには、ウイルスが感染する魚類の当該ウイルスに感受性を有する株化細胞が必要不可欠である。魚類由来の株化細胞は、ニジマス卵巣由来の線維芽性株化細胞であるRTG-2細胞が樹立されて以来、数多くの株化細胞が報告されている。しかしながら、その多くはサケ科魚類やコイ科魚類などの限られた魚類から分離培養して樹立された線維芽性のものであり、また、上皮性のものは少ない。従って、種々の魚類において、そのウイルス感染症の診断やウイルス自体の分離などが必ずしも円滑に行えているとはいえないのが現状である。

#### 【0003】

##### 【発明が解決しようとする課題】

ところで、チョウザメ (sturgeon) は、およそ3億年前から生存していた古代種であるが、その卵はキャビアとして珍重されているほか、チョウザメの肉も食用として利用価値が高いことから、今後の養殖対象魚類として期待されている。このような状況下においては、チョウザメのウイルス感染症の診断を行うための株化細胞が必要不可欠となる。しかしながら、例えば、Transactions of the American Fisheries Society 120:528-534, 1991には、Acipenser 属に属する白チョウザメの株化細胞が報告されているが、チョウザメの株化細胞に関する報告はさほど多くはない。従って、チョウザメのウイルス感染症の診断などへの利用が期待される新規な株化細胞を樹立することは大変意義深いことであり、新規な株化細胞が樹立できれば、その株化細胞は、チョウザメのウイルス感染症に対して有効なワクチンを製造する際や、化学物質や重金属などの細胞毒性試験を行う際などにおいても価値が高いものとなりうる。

そこで本発明は、チョウザメのウイルス感染症の診断などへの利用が期待される新規な株化細胞を提供することを目的とする。

#### 【0004】

##### 【課題を解決するための手段】

上記の点に鑑みてなされた本発明は、請求項 1 記載の通り、チョウザメ眼球由来の株化細胞である。

また、請求項 2 記載の株化細胞は、チョウザメがベステルである。

また、請求項 3 記載の株化細胞は、眼球上皮細胞由来である。

また、請求項 4 記載の株化細胞は、虹彩色素上皮細胞由来である。

また、請求項 5 記載の株化細胞は、細胞外基質を添加することなしに継代培養が可能なものである。

また、請求項 6 記載の株化細胞は、50 回以上の継代培養が可能なものである。

また、請求項 7 記載の株化細胞は、20℃での培養開始後 2 日目～6 日目のダブルリングタイムが 50 時間未満であるものである。

また、請求項 8 記載の株化細胞は、培養皿に添加してから接着するまでの着定率が 1 時間後に 75% 以上であるものである。

また、請求項 9 記載の株化細胞は、チョウザメ眼球由来の株化細胞である STIP-1 細胞 (FERM P-18909) である。

また、請求項 10 記載の株化細胞は、チョウザメ眼球由来の株化細胞である STIP-3 細胞 (FERM P-18910) である。

#### 【0005】

#### 【発明の実施の形態】

本発明の株化細胞の由来となるチョウザメとしては、例えば、Huso 属や前掲の Acipenser 属に属するものが挙げられるが、好適には Huso 属に属するペルーガ (H. Huso) の雌と Acipenser 属に属するステールリヤチ (A. ruthenus) の雄から作出された品種改良種であるベステル (Beste) が挙げられる。ベステルは交雑種であるため、ベステル由来の株化細胞は、各種のウィルスに対する感受性に関して Huso 属チョウザメの細胞と Acipenser 属チョウザメの細胞の双方の特性を兼ね備えていることが期待されるからである。

#### 【0006】

本発明の株化細胞は眼球由来の株化細胞である。一般に、魚類細胞を分離培養



する場合、腎臓や卵巣を由来とする細胞を用いるが、これらの組織から上皮細胞のみを選択して分離培養するためには多大な時間と労力を必要とする。しかしながら、眼球由来の細胞を用いることにより、上皮細胞由来の株化細胞の樹立が容易となる。

## 【 0 0 0 7 】

次に、本発明の株化細胞を、眼球のどの組織の上皮細胞から樹立するかであるが、この点については、外界と非接触の状態で存在する虹彩色素上皮細胞や網膜色素上皮細胞などから樹立することが望ましい。腎臓や卵巣を由来とする細胞は微生物汚染の可能性が否定できないが、虹彩色素上皮細胞や網膜色素上皮細胞などは元来、微生物汚染の可能性がないので、無菌的に細胞を取出せば、その後の作業を無菌的に行うことで株化細胞の微生物汚染を確実に防ぐことができるからである。

## 【 0 0 0 8 】

株化細胞の樹立方法は、公知の方法に従って、初代培養細胞を継代培養することで行えばよい。培地は、魚類細胞の培養に通常用いられる L 1 5 培地に牛胎児血清 (FBS) を加えたようなものでよい。

## 【 0 0 0 9 】

## 【実施例】

以下に実施例を挙げ、本発明を具体的に説明する。

## 【 0 0 1 0 】

実施例 1 : チョウザメ眼球由来の株化細胞の樹立

## 1. ベステル眼球からの虹彩色素上皮細胞の分離

体長約 15 cm のベステル 30 尾から眼球を摘出して 70 % エタノール中で殺菌処理した後、殺菌処理した眼球をペニシリンとストレプトマイシンを添加した PBS ( - ) 中でよく洗浄した。その後、眼球から角膜とレンズを取り除いて虹彩を切り出した。こうして得られた虹彩を 0.05 % EDTA で約 40 分間処理し、虹彩色素上皮細胞と、虹彩のストローマや強膜などの結合組織との分離を容易にした後、これらの結合組織を取り除き、分離したシート状の虹彩色素上皮細胞を 0.125 % トリプシンで酵素処理してシングルセル状態の細胞 (初代細胞

)を得た。

#### 【0011】

### 2. 初代培養

上記のようにして得られた初代細胞を、直径3.5cmプラスチックディッシュ（培養皿）に加えた、Leibovitz's L15培地（Gibco社製）に10%FBS（Gibco社製の牛胎児血清）とペニシリン（10unit/ml）とストレプトマイシン（50 $\mu$ g/ml）を添加した培地を用い、20℃のCO<sub>2</sub>インキュベータ内（但し大気雰囲気）で培養した。初代細胞の中から増殖性の優れた細胞を選択し、継代培養を繰り返した。

#### 【0012】

### 3. 継代培養

培養皿が細胞で集密的（confluent）な状態になったら、0.05%EDTAと0.125%トリプシンを含有する溶液で細胞を培養皿から剥離し遠心分離により細胞を回収し、別の培養皿に移し、上記の培地を用いて培養を継続した。これを繰り返すことによって、長期間培養可能な2種類の株化細胞（STIP-1細胞とSTIP-3細胞）を得た。いずれの株化細胞も、継代培養の際、コラーゲンなどの細胞外基質を培養皿底面にコーティングするといったような添加をしなくても培養皿に着定した。なお、上記の2種類の株化細胞は独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されており、それらの受託番号は、STIP-1細胞がFERM P-18909、STIP-3細胞がFERM P-18910である。この特許出願の時点において、株化細胞STIP-1の継代培養回数は140回を超え、株化細胞STIP-3の継代培養回数は80回を超える。

#### 【0013】

### 実施例2：STIP-1細胞とSTIP-3細胞の特性

#### 1. 細胞の形態

STIP-1細胞は細長い細胞であるが上皮性の細胞であった（図1参照：培養開始後8日目の倍率100倍の顕微鏡写真）。一方、STIP-3細胞は典型的な敷石状の上皮性の細胞であった（図2参照：培養開始後14日目の倍率10

0 倍の顕微鏡写真)。

【0014】

## 2. 細胞の温度特性

図3に示したように、STIP-1細胞は15℃～32℃の広い温度範囲で良好な増殖性を示し、特に20℃での増殖性が優れていた。20℃での培養開始後2日目～6日目の細胞のダブリングタイム(指数関数的に細胞が増殖する時間)は38.9時間であり、RTG-2細胞と比較して約2倍の増殖速度を有していた。一方、図4に示したように、STIP-3細胞は15℃～20℃で良好な増殖性を示したが、30度以上ではその増殖性は阻害された。20℃での培養開始後2日目～6日目の細胞のダブリングタイムは74.9時間であった。

【0015】

## 3. 細胞増殖に対するFBSの影響

図5に示したように、STIP-1細胞を増殖せしめるために必要なL15培地に添加されるFBSの濃度は4%で足りた。また、図6に示したように、STIP-3細胞を増殖せしめるために必要なL15培地に添加されるFBSの濃度も4%で足りた。よって、これらの株化細胞を増殖せしめるために必要なFBSは少量であることから、これらの株化細胞の大量培養は経済的に有利であることがわかった。

【0016】

## 4. 細胞の染色体数

STIP-1細胞とSTIP-3細胞の染色体数を、継代培養80回目の細胞について、培養6日目の対数増殖期の細胞にコルヒチン処理を行う常法にて調べた。具体的には、細胞に最終濃度が0.20 $\mu$ g/mlになるようにコルヒチンを加え、18時間培養した後に培地を取り除いてから細胞をPBS(-)で洗浄した。次に、0.05%EDTAと0.125%トリプシンを含有する溶液で細胞を培養皿から剥離し遠心分離により細胞を回収した。こうして回収した細胞に0.075MのKClを添加して室温にて20分間静置して低張処理を行った。低張処理した細胞懸濁液はカルノア液を用いて20分間水中で固定した後、フレイムドライ法によって染色体標本とした。これをギムザ染色し、顕微鏡(倍率1

0 0 0 倍) で染色体を計数した。その結果、S T I P - 1 細胞の染色体数は  $2n = 166 \pm 7.6$  本、S T I P - 3 細胞の染色体数は  $2n = 121 \pm 6.1$  本となり、いずれの細胞もベステルの染色体数である  $2n = 117$  本と比較して増加していた (図 7 参照)。この結果は、いずれの細胞も株化細胞であることを特徴付けるものである。染色体を分類すると、いずれの細胞も基本的には 2 倍体であるが、ランダムに異数性を示していた。 $2n = 173$  本の S T I P - 1 細胞の一例の染色体標本を図 8 に、 $2n = 126$  本の S T I P - 3 細胞の一例の染色体標本を図 9 に示す。

【0 0 1 7】

#### 5. 細胞の接着性

S T I P - 1 細胞の培養皿への接着性を、細胞を培養皿に添加してから接着するまでの時間 (着定率: P l a t i n g E f f i c i e n c y : 一定時間後に培養皿に定着した細胞数を細胞皿に添加した全細胞数で割った値を百分率で表したもの) により調べた。結果を図 1 0 に示す。図 1 0 から明らかなように、S T I P - 1 細胞は細胞を培養皿に添加してから 5 分後には 5 1. 4 % の着定率を示し、1 時間後には 8 3. 5 %、2 4 時間後には 9 4. 8 % と極めて高い数値を示した。

【0 0 1 8】

#### 【発明の効果】

本発明によれば、チョウザメのウィルス感染症の診断への利用が期待される他、チョウザメのウィルス感染症に対して有効なワクチンを製造する際や、化学物質や重金属などの細胞毒性試験を行う際などにおいても価値が高いものとなりうるチョウザメ眼球由来の株化細胞が提供される。

#### 【図面の簡単な説明】

【図 1】 S T I P - 1 細胞の顕微鏡写真。

【図 2】 S T I P - 3 細胞の顕微鏡写真。

【図 3】 各温度における S T I P - 1 細胞の増殖曲線。

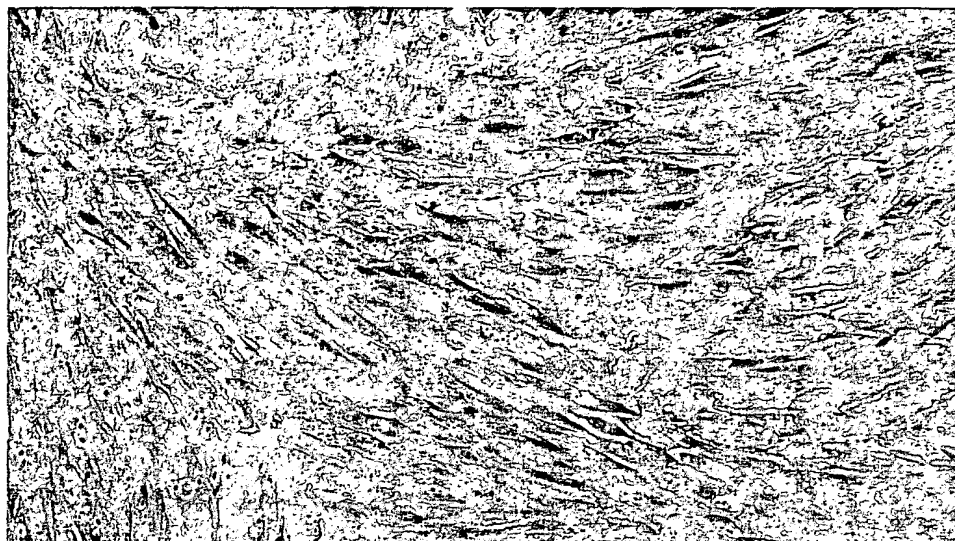
【図 4】 各温度における S T I P - 3 細胞の増殖曲線。

【図 5】 S T I P - 1 細胞の増殖に対する F B S の影響を示すグラフ。

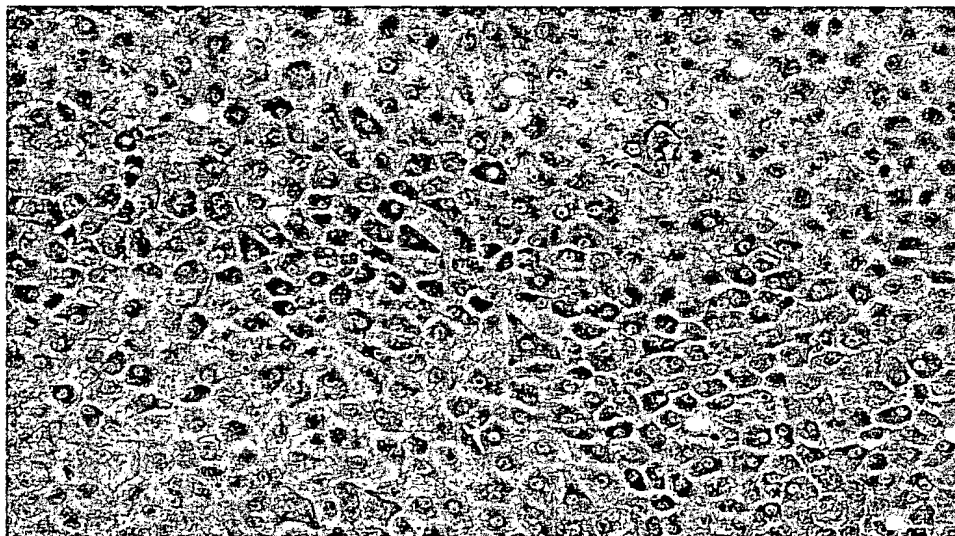
- 【図 6】 STIP-3 細胞の増殖に対する FBS の影響を示すグラフ。
- 【図 7】 STIP-1 細胞と STIP-3 細胞の染色体数を示すグラフ。
- 【図 8】 STIP-1 細胞の染色体標本。
- 【図 9】 STIP-3 細胞の染色体標本。
- 【図 10】 STIP-1 細胞の培養皿への接着性を示すグラフ。

【書類名】 図面

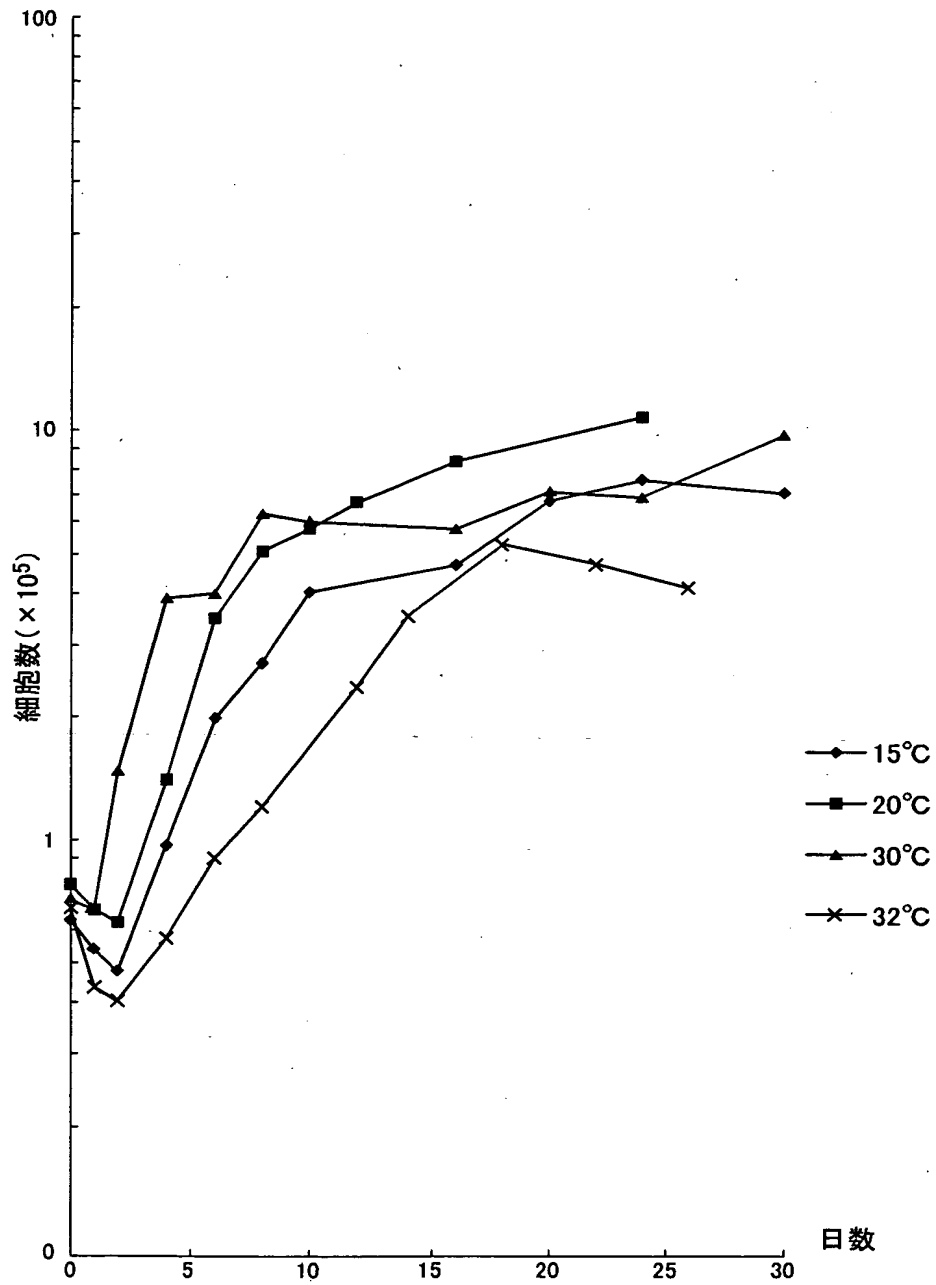
【図1】



【図2】

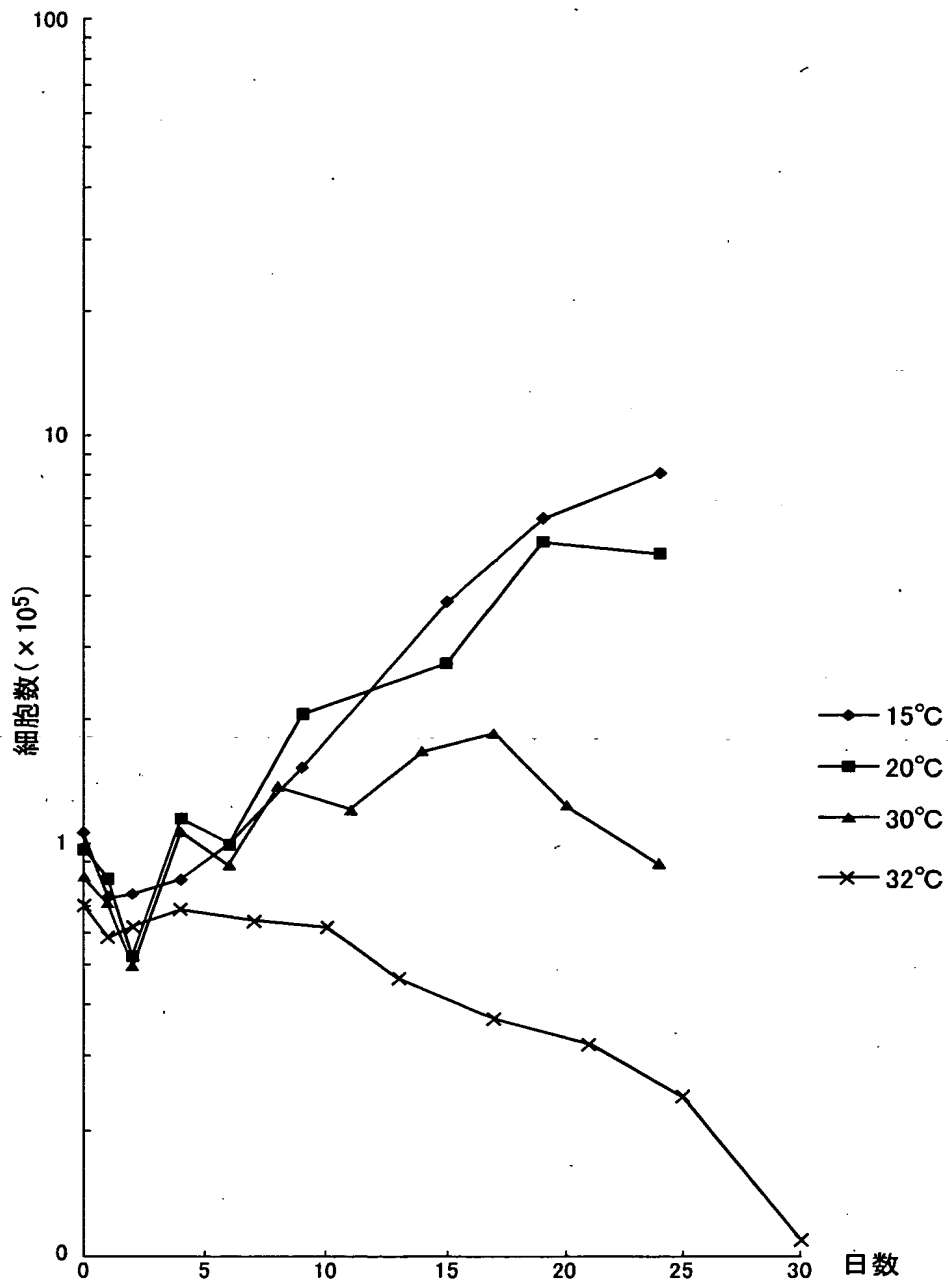


【図 3】



各温度におけるSTIP-1細胞の増殖曲線

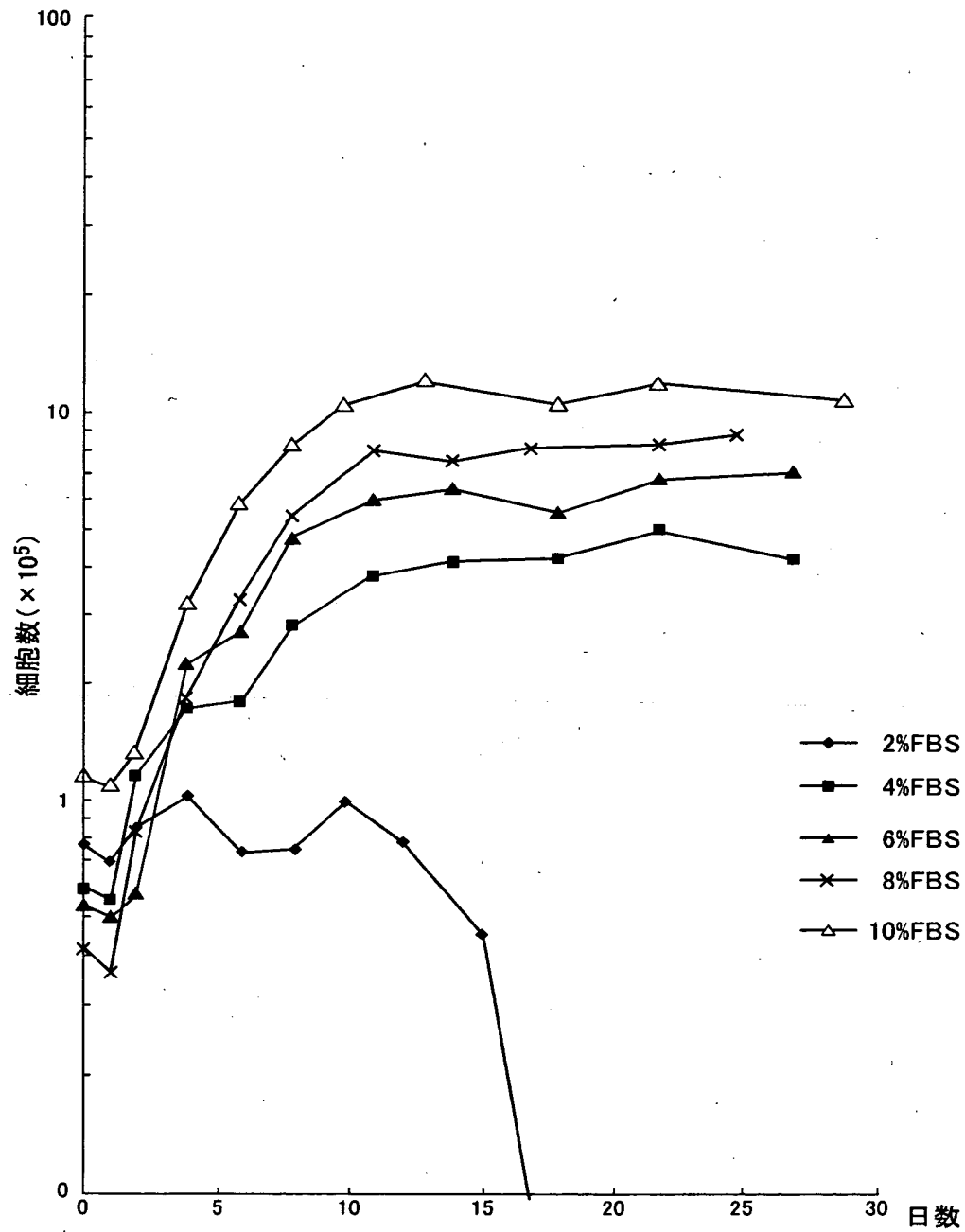
【図 4】



各温度におけるSTIP-3細胞の増殖曲線

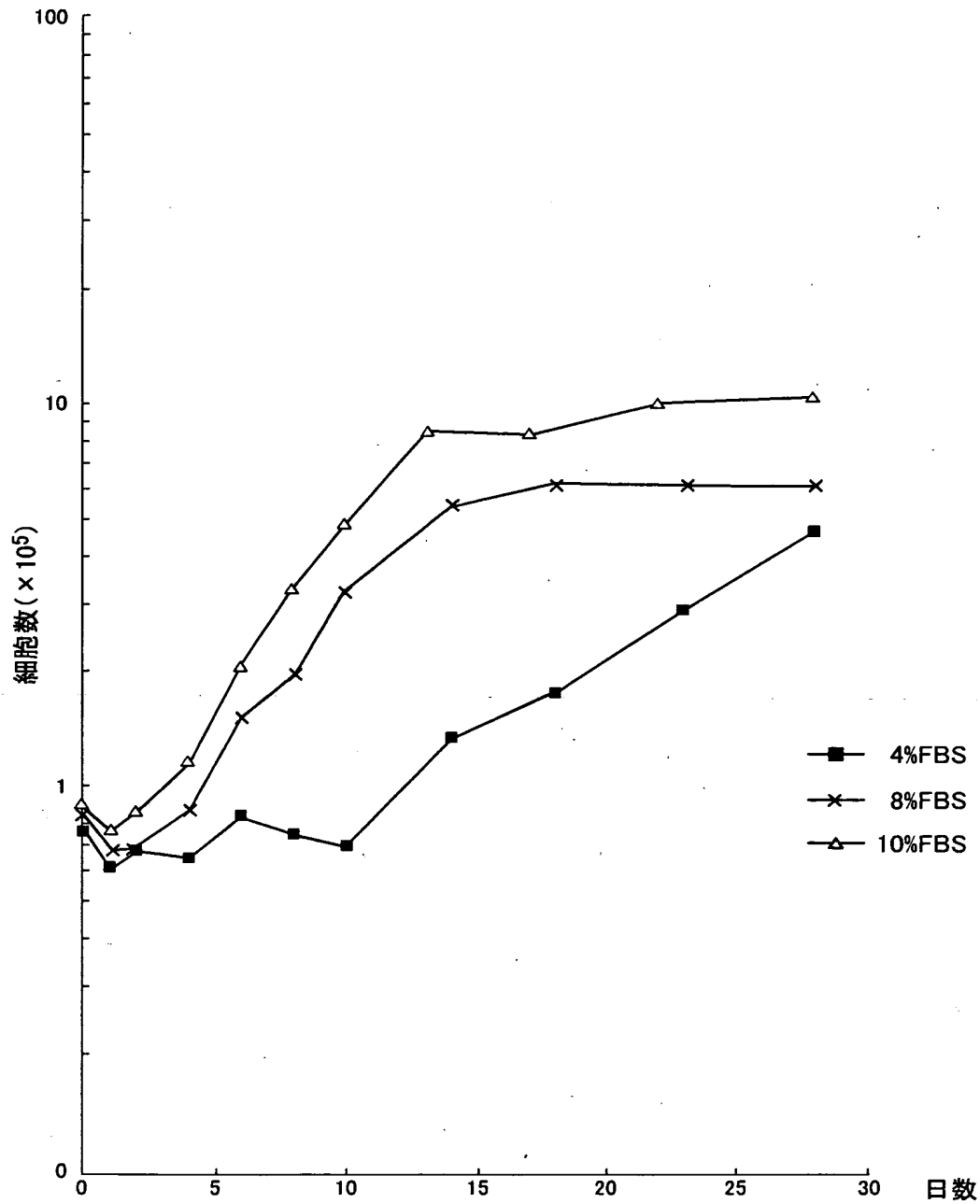


【図5】



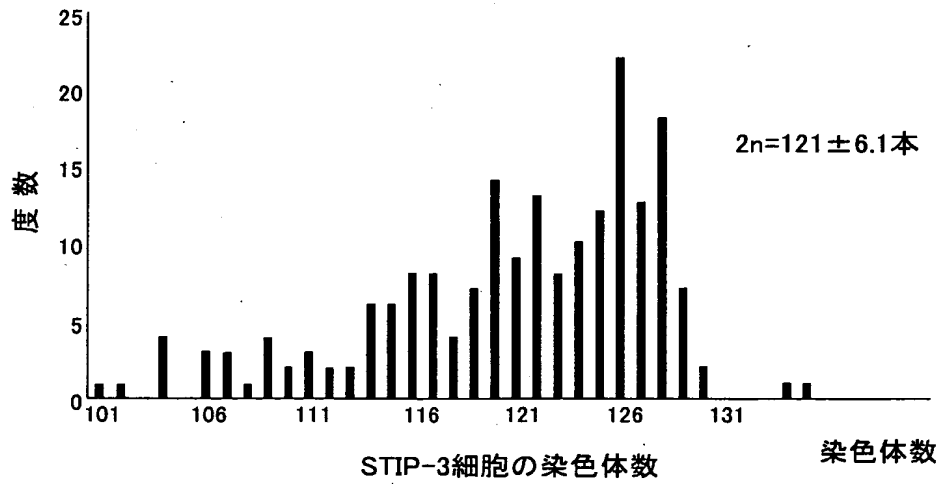
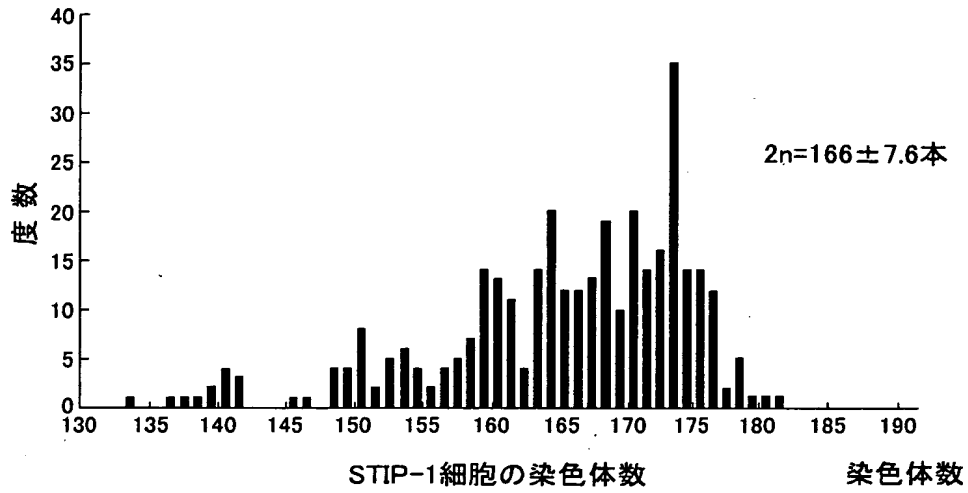
L-15培地に添加した牛胎児血清(FBS)がSTIP-1細胞の増殖に与える影響

【図6】

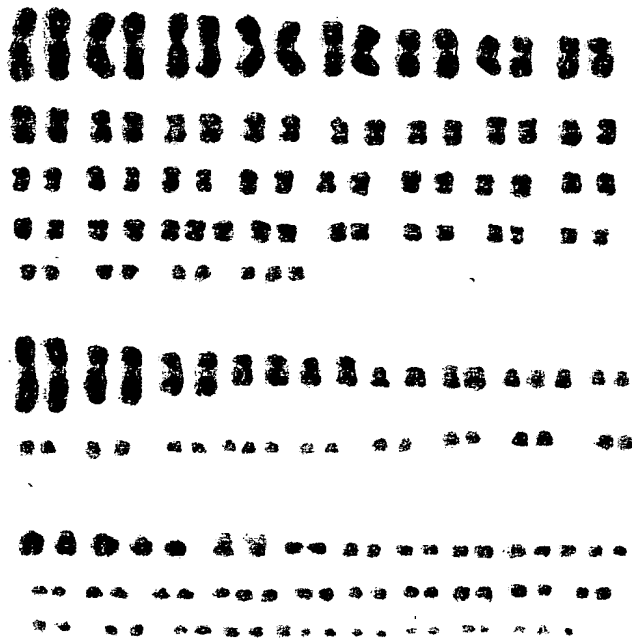


L-15培地に添加した牛胎児血清(FBS)がSTIP-3細胞の増殖に与える影響

【図 7】

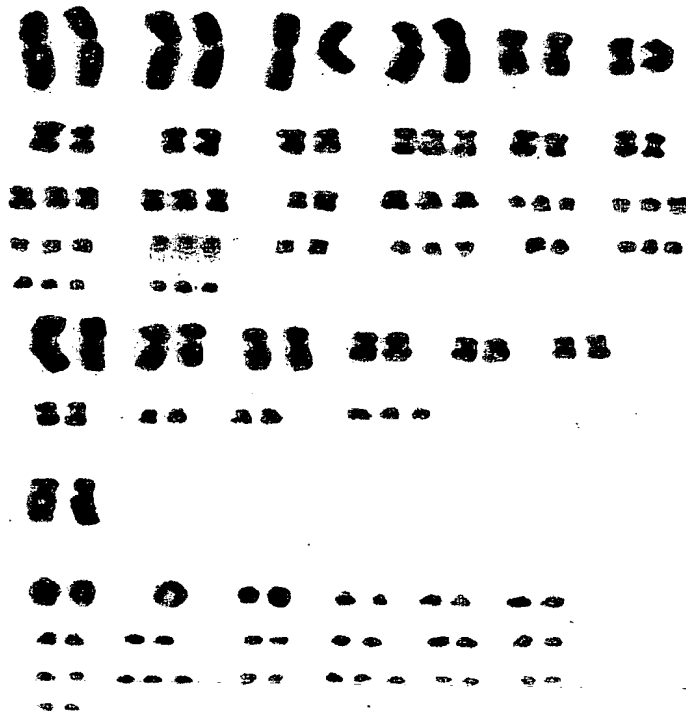


【図8】



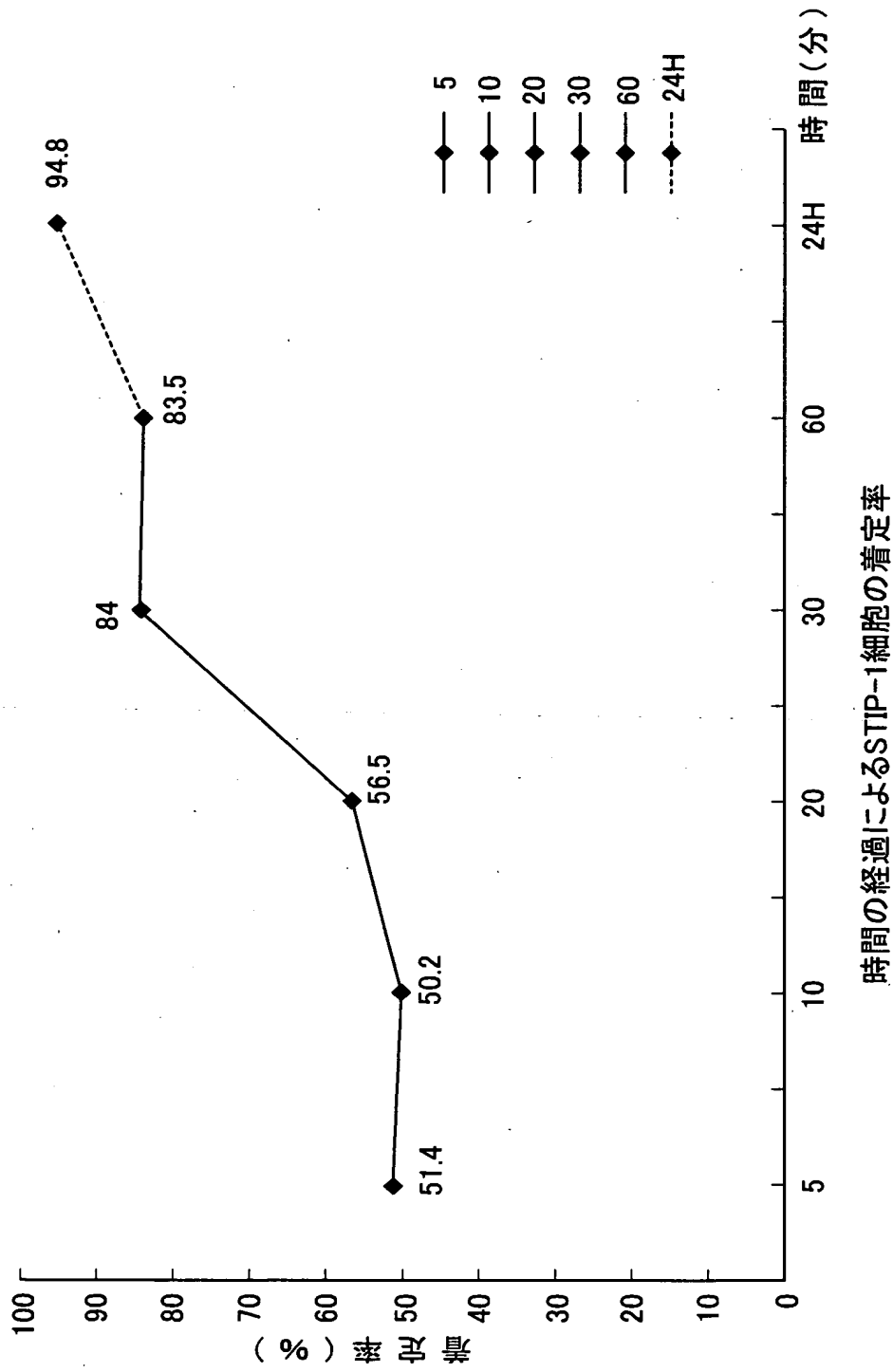
STIP-1細胞から作出した染色体標本( $2n=173$ ).  
 中部動原体型(M型)74本、次中部動原体型(SM型)38本、  
 次端部型(ST型)0本、末端動原体型61本

【図9】



STIP-3細胞から作出した染色体標本( $2n=126$ ).  
 中部動原体型(M型)64本、次中部動原体型(SM型)21本、  
 次端部型(ST型)2本、末端動原体型39本

【図 10】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 チョウザメのウィルス感染症の診断などへの利用が期待される新規な株化細胞を提供すること。

【解決手段】 本発明は、チョウザメ眼球由来の株化細胞であり、具体的には、STIP-1細胞（FERM P-18909）とSTIP-3細胞（FERM P-18910）が挙げられる。

【選択図】 図1

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-189282
受付番号	50200948857
書類名	特許願
担当官	宇留間 久雄 7277
作成日	平成14年 7月 1日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 6月28日
【特許出願人】	
【識別番号】	390033857
【住所又は居所】	大阪府大阪市西区立売堀2丁目3番2号
【氏名又は名称】	株式会社フジキン
【代理人】	申請人
【識別番号】	100087745
【住所又は居所】	東京都新宿区高田馬場2丁目14番4号 八城ビル3階
【氏名又は名称】	清水 善▲廣▼
【選任した代理人】	
【識別番号】	100098545
【住所又は居所】	東京都新宿区高田馬場2丁目14番4号 八城ビル3階
【氏名又は名称】	阿部 伸一
【選任した代理人】	
【識別番号】	100106611
【住所又は居所】	東京都新宿区高田馬場2丁目14番4号 八城ビル3階
【氏名又は名称】	辻田 幸史



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [390033857]

1. 変更年月日	1990年11月30日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市西区立売堀2丁目3番2号
氏 名	株式会社フジキン